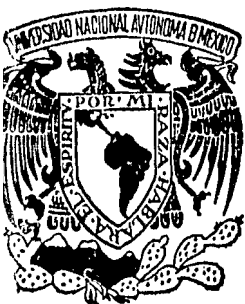


L. G. M.



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA DETERMINACION DE
VARIOTINA POR CILINDRO PLACA Y SENSIDISCOS**

T E S I S

AIDA ABRAJAN ASTUDILLO

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

- I.- Objetivo
- II.- Introducción
- III.- Generalidades
- IV.- Parte Experimental
- V.- Resultados
- VI.- Análisis de Resultados y Conclusiones
- VII.- Revisión Bibliográfica
- VIII.- Bibliografía.

I.- OBJETIVO.

El objetivo que se persigue al realizar el presente trabajo, es el de establecer, el método microbiológico de difusión en placa de agar para la determinación de la potencia de la Variotina, frente a *Penicillium chrysogenum* por ser un microorganismo sensible a este antibiótico.

II.- INTRODUCCION ANTIBIOTICOS.

El término antibiótico fue propuesto por Waksman, descubridor de la estreptomocina, para definir sustancias dotadas de actividad antimicrobiana, y extraídas de estructuras orgánicas vivientes. En 1880 Vuillemin en un trabajo titulado " Antibiose et Symbiose ", crea el término " antibiosis ", que describe la lucha entre seres por la supervivencia. Posteriormente, Ward adopta esta palabra para describir el antagonismo microbiano. Algún tiempo después, ya en plena era antibiótica el término significó sustancia extraída de seres vivos, ya fueran estos: bacterias, hongos, o algas, con capacidad para anular la vida de diversos microorganismos.

Esta génesis era primordial para distinguirlos de los quimioterapéuticos.

El antibiótico provenía de un mundo vivo, el quimioterapéutico del laboratorio. Pero el avance de la técnica, el conocimiento progresivo de las fórmulas de diversos antibióticos, la posibilidad de su preparación sintética partiendo de bases químicas puras desdibujaron el valor del origen para calificarlo como antibiótico o quimioterapéutico.

Los agentes quimioterapéuticos son las sustancias químicas que se emplean para el tratamiento de las enfermedades infecciosas o de las afecciones causadas por la proliferación de microorganismos patógenos.

Para poder emplearse como agente quimioterapéutico una sustancia debe poseer baja toxicidad para las células -

hospederas o sea que:

- 1.- Debe destruir o prevenir la actividad del patógeno sin dañar las células del hospedero, o causándoles un daño mínimo.
- 2.- Debe entrar en contacto con el patógeno penetrando en las células y difundiéndose en los tejidos del hospedero en concentración eficaz.
- 3.- No debe interferir en los mecanismos naturales de defensa del hospedero, como la fagocitosis y la formación de anticuerpos.

Los antibióticos son una clase especial de agentes químico terapéuticos que se obtienen generalmente de organismos vivos. La palabra antibiótico designa al producto metabólico de un organismo que es perjudicial o inhibitorio para otros microorganismos en muy pequeñas cantidades.

Los organismos vivos se protegen de otros por varios medios

- 1.- Los desalojan físicamente, o los matan de inanición utilizando los alimentos disponibles.
- 2.- Hacen el medio desfavorable para sus competidores: demasiado ácido o demasiado básico, o modificando la presión osmótica o la tensión superficial.
- 3.- Segregan sustancias específicas que interfieren el metabolismo de otras especies evitando su desarrollo o destruyéndolas.

PROPIEDADES DE UN ANTIBIOTICO EFICAZ.

Para ser verdaderamente beneficiosos deben poseer todas las cualidades de un agente quimioterapéutico y además las siguientes.

- 1.- Destruir o inhibir muchas especies diferentes de microorganismos. Esto es lo que se entiende por " antibióticos de amplio espectro ".
- 2.- Dificultar al desarrollo de formas resistentes de los patógenos.
- 3.- No producir efectos secundarios desagradables, como reacciones de sensibilización o alérgicas, lesiones en los nervios o irritación de los sistemas renal y gastro intestinal.
- 4.- No modificar o suprimir la flora microbiana " normal " del hospedero, porque al hacerlo así se perturba el equilibrio de la Naturaleza, permitiendo que los microbios que no son patógenos de ordinario, o formas patógenas facultativas que están reprimidas normalmente por la flora habitual establezcan una nueva infección.

LA BUSQUEDA DE NUEVOS ANTIBIOTICOS.

Sir Alexander Fleming dijo en una ocasión que su descubrimiento podría haber sido más notable si la penicilina fuera el mejor y más eficaz de los antibióticos que se descubrieran jamás. Profetizó así, que a medida que fueran descubriéndose nuevos antibióticos se encontraría alguno que tendría propiedades benéficas que le faltaban a la penicilina.

Podría tener más amplio espectro de acción, menos toxicidad, mayor estabilidad y actividad más duradera.

Aunque la penicilina sigue siendo uno de los antibióticos más eficaces, continúa la exploración en busca de aquel ideal.

Entre los mejores se encuentran aquellos que atacan a ---
gérmenes patógenos que no responden al tratamiento por la -
penicilina o que desarrollan resistencia a este antibiótico.

Si bien los antibióticos de amplio espectro son muy valio-
sos, los que poseen actividad contra grupos específicos, --
como los hongos, protozoos, y los virus son armas sumamente
estimadas en el arsenal médico.

Los antibióticos más conocidos y más eficaces hasta ahora
se producen por 3 géneros de microorganismos:

Bacillus, *Penicillium*, y *Streptomicis*, todos los cuales --
se encuentran naturalmente en el suelo y en gran abundancia.

El suelo se ha estudiado extensamente, investigando la ---
existencia de microbes capaces de producir nuevos antibió-
ticos.

Ahora bien, la eficacia de los antibióticos desde el pun-
to de vista terapéutico, se demuestra por la inhibición que
efectúan sobre microorganismos específicos bajo condiciones-
especiales.

Los cambios sutiles debidos a la disminución de la activi-
dad antimicrobiana, aún no se pueden demostrar por métodos-
químicos, pero si mediante valoraciones microbiológicas ---
utilizando cultivos tipo. Para la valoración se emplean dos
métodos generales:

El de cilindro en placa y el turbidimétrico.

El primero, se basa en la difusión del antibiótico desde un
cilindro vertical sobre una placa de agar solidificado que-

que contiene el germen prueba, depositado en una caja Petri.

La zona de inhibición prevista del microorganismo es un área circular que queda alrededor del cilindro que contiene la solución antibiótica.

El segundo se basa en el desarrollo de un cultivo microbiano en un medio líquido que contiene una solución uniforme del antibiótico: dicho medio favorece el rápido desarrollo microbiano en ausencia del antibiótico.

El método microbiológico de difusión en placa de agar es el método seleccionado para el desarrollo del presente trabajo.

Se ha escogido este tipo de análisis por la gran sensibilidad que presenta y por considerarse que tiene una exactitud confiable.

La valoración fue realizada con dos variantes, basadas en el mismo principio de difusión, utilizándose para ellosensidiscos de papel filtro y cilindros de acero inoxidable o penicilindros.

III.- GENERALIDADES.

3.1. En los estudios de antibióticos dirigidos por el profesor Sumuki, efectuados en el Instituto de Micología Aplicada de la Universidad de Tokio, los investigadores obtuvieron una sustancia fungicida en el filtrado de un cultivo de hongos que designaron con el número K - 5201 que fue aislado del suelo.

La cepa número K - 5201 fue investigada y clasificada como Pecilomices varioti Bainier variedad antibiótica y el antibiótico producido por esta cepa -- fue llamado Variotina, el cual se encontró que tenía baja toxicidad.

3.2. PRODUCCION DE VARIOTINA.

La cepa empleada para la producción de Variotina -- fue Pecilomices varioti Bainier variedad antibiótica, para ello se utilizó un cultivo agitado en tanque de fermentación aireado, la fuente de carbono -- más apropiada quedó determinada por el siguiente -- método.

Al medio basal conteniendo nitrato de sodio al 0.3 %, se le agregó en el siguiente orden:

Fosfato dibásico de potasio	0.2	%
Sulfato de magnesio (hidratado)	0.05	%
Cloruro de potasio (hidratado)	0.05	%
Sulfato ferroso (hidratado)	0.001	%

Al medio, a un pH de 6.0, le fueron agregadas las fuentes de carbono en un 3.0 %, como se muestra en la tabla #. 1.

Tabla # 1. Efecto de la fuente de carbono en la producción de variotina.

Fuente de carbono	2 días		3 días		4 días		5 días		6 días		7 días	
	pH	u/ml.	pH	u/ml.	pH	u/ml.	pH	u/ml.	pH	u/ml.	pH	u/ml.
Sacarosa	5.6	2.0	6.0	19	6.2	28	6.2	35	5.4	6	5.4	10
Glucosa	5.6	0	5.6	6	5.4	12	5.4	17	5.4	9	5.2	6
Fructuosa	5.6	0	6.0	6	6.2	10	5.8	15	5.8	10	6.2	14
Manosa	5.8	0	6.0	5	6.2	14	6.0	21	5.6	12	5.8	14
Glicerol	5.8	0	5.8	0	6.2	4	6.6	13	5.6	6	6.6	0
Manita	5.6	0	5.6	0	6.2	2	6.2	0	6.4	0	6.8	0
Maltosa	6.0	0	6.6	5	6.6	5	6.8	5	5.7	5	5.4	6
Almidón	6.0	2	6.2	7	6.6	10	6.6	10	6.7	16	6.6	-
Xilosa	6.0	0	6.0	0	6.2	4	6.0	8	6.2	0	6.2	0
Lactosa	6.0	0	6.0	0	6.2	0	6.3	2	6.2	0	6.2	0
Galactosa	6.0	0	6.4	0	6.6	0	6.5	2	6.2	0	6.4	0

La sacarosa fue la fuente de carbono más apropiada -- para la producción de variotina. La cepa número K - 5201 fue inoculada dentro de matraces de 500 ml. los cuales contenían 100 ml. de medio de cultivo estéril que se incubaron a 25°C de 3 - 6 días con agitación, la actividad alcanzó el máximo, decreciendo después rápidamente.

Como se muestra en la tabla # 2, se buscó también la fuente de nitrógeno más apropiada, agregando al mismo medio basal conteniendo 3 % de sacarosa las siguientes fuentes de nitrógeno en las siguientes concentraciones.

Nitrato de sodio	0.3	%
Nitrato de amonio	0.5	%
Sulfato de amonio	0.5	%
Harina de frijol de soya	0.5	%
Harina de cacahuete	0.5	%
Harina de semilla de algodón	0.5	%
Extracto de carne	0.5	%
Peptona	0.5	%
Infusión de licor de maíz	1.0	%

El cultivo se hizo de la misma manera y se encontró -- que la fuente más apropiada de nitrógeno era la inorgánica para la producción de variotina. De esta manera se determinó que el medio más adecuado para la -- producción de variotina fue la siguiente.

Sacarosa	3.0	%
Fosfato dibásico de potasio	0.20	%

Tabla # 2. Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de variotina.

Fuente de nitrógeno	2 días pH u/ml.	3 días pH u/ml.	4 días pH u/ml.	5 días pH u/ml.	6 días pH u/ml.	7 días pH u/ml.
Nitrato de sodio	6.2 1	6.2 10	6.0 20	5.8 14	6.0 10	6.8 8
Nitrato de amonio	6.0 2	6.0 8	5.8 16	6.0 10	6.2 6	6.6 6
Sulfato de amonio	6.0 2	6.2 5	5.8 15	6.0 16	6.4 4	6.6 0
Harina de soya	5.6 0	5.4 0	5.4 0	6.6 4	6.8 0	7.0 0
Harina de cacahuete	- 0	- 2	- 8	- 0	- 0	- 0
Harina de semilla de algodón	- 0	- 0	- 8	- 4	- 0	- 0
Extracto de carne	5.4 0	5.4 3	5.4 4	5.4 3	5.6 3	5.4 0
Peptona	5.4 1	5.4 10	5.2 1	5.4 0	6.6 0	7.0 0
Infusión de licor de maíz	5.6 0	5.4 0	5.4 0	5.4 2	5.4 10	5.4 10

Cloruro de potasio	0.05	%
Sulfato de magnesio	0.05	%
Sulfato ferroso (hidratado)	0.001	%
Nitrato de sodio	0.3	%
(ó nitrato de amonio 0.3 %, sulfato de amonio 0.3%).		

Con este medio se cargó el tanque de fermentación el que se inoculó con las esporas de la cepa productora de variotina, se incubó por una semana a 25°C hasta la esporulación; después de 90 horas de fermentación, la actividad de variotina en el filtrado alcanzó el máximo (16 u/ml.) .

3.3. SEPARACION Y PURIFICACION DE VARIOTINA.

86 litros de caldo de cultivo y el micelio fueron extraídos dos veces con acetato de etilo. Los extractos se combinaron y concentraron hasta obtener una consistencia siruposa de color café por evaporación con vacío. El residuo siruposo fue disuelto en metanol y después precipitado y por refrigeración se removieron las impurezas. La solución metanólica se evaporó con vacío y el residuo siruposo se disolvió en éter, siendo removidas las impurezas por filtración.

La solución de éter quedó concentrada bajo presión a un volumen pequeño y le fueron añadidos diez volúmenes de éter de petróleo, enfriando enseguida.

Se precipitó una substancia aceitosa que fue separada del solvente por decantación y lavada con éter de petróleo. La substancia aceitosa se disolvió en tetracloruro de carbono, las impurezas café rojizas fueron

Tabla # 2. Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de variotina.

Fuente de nitrógeno	2 días pH u/ml.	3 días pH u/ml.	4 días pH u/ml.	5 días pH u/ml.	6 días pH u/ml.	7 días pH u/ml.
Nitrato de sodio	6.2 1	6.2 10	6.0 20	5.8 14	6.0 10	6.8 8
Nitrato de amonio	6.0 2	6.0 8	5.8 16	6.0 10	6.2 6	6.6 6
Sulfato de amonio	6.0 2	6.2 5	5.8 15	6.0 16	6.4 4	6.6 0
Harina de soya	5.6 0	5.4 0	5.4 0	6.6 4	6.8 0	7.0 0
Harina de cacahuete	- 0	- 2	- 8	- 0	- 0	- 0
Harina de semilla de algodón	- 0	- 0	- 8	- 4	- 0	- 0
Extracto de carne	5.4 0	5.4 3	5.4 4	5.4 3	5.6 3	5.4 0
Peptona	5.4 1	5.4 10	5.2 1	5.4 0	6.6 0	7.0 0
Infusión de licor de maíz	5.6 0	5.4 0	5.4 0	5.4 2	5.4 10	5.4 10

Cloruro de potasio	0.05	%
Sulfato de magnesio	0.05	%
Sulfato ferroso (hidratado)	0.001	%
Nitrato de sodio	0.3	%
(ó nitrato de amonio 0.3 %, sulfato de amonio 0.3%).		

Con este medio se cargó el tanque de fermentación el que se inocularon con las esporas de la cepa productora de variotina, se incubó por una semana a 25°C hasta la esporulación; después de 90 horas de fermentación, la actividad de variotina en el filtrado alcanzó el máximo (16 u/ml.) .

3.3. SEPARACION Y PURIFICACION DE VARIOTINA.

86 litros de caldo de cultivo y el micelio fueron extraídos dos veces con acetato de etilo. Los extractos se combinaron y concentraron hasta obtener una consistencia siruposa de color café por evaporación con vacío. El residuo siruposo fue disuelto en metanol y después precipitado y por refrigeración se removieron las impurezas. La solución metanólica se evaporó con vacío y el residuo siruposo se disolvió en éter, siendo removidas las impurezas por filtración.

La solución de éter quedó concentrada bajo presión a un volumen pequeño y le fueron añadidos diez volúmenes de éter de petróleo, enfriando enseguida.

Se precipitó una substancia aceitosa que fue separada del solvente por decantación y lavada con éter de petróleo. La substancia aceitosa se disolvió en tetracloruro de carbono, las impurezas café rojizas fueron

desechadas en las masas insolubles. El proceso de la extracción se representa en la figura # 1, la evaporación del solvente con vacío dió una substancia aceitosa ligeramente amarillenta con una actividad de variotina de 145 u/mg.

Las siguientes purificaciones de variotina fueron hechas por un contador de distribución de corriente de 130 tubos usando una mezcla de metanol al 70 % y tetracloruro de carbono 1;1.

La distribución de variotina fue en los tubos del número 47 al 73, el pico fue en el tubo # 61, la curva de distribución fue dibujada por bio - actividad.

La fórmula propuesta más probable fue: $C_{18}H_{27}NO_4$.

La cual al sufrir una catalisis con platino perdió agua quedando : $C_{17}H_{25}NO_3$.

El espectro de absorción al ultravioleta es de 320 nm. El pico de la substancia seca se midió con la curva teórica, indicando que la variotina es una substancia singular o simple.

3.4. PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE VARIOTINA.

3.4.1. NOMBRE QUIMICO. N - (8 - hidroxil - 6 - metil - trans - trans - cis - dodeca - 2 - 4 - 6 - trienoil) - 2 - pirrolidona.

3.4.2. PESO MOLECULAR. 291.38

3.4.3. FORMULA CONDENSADA. $C_{17}H_{25}NO_3$.

Figura no. 1. Extracción de variotina.

86 litros del cultivo filtrado (16 u/ml.)

Capa del solvente. 50 l. lavado con agua

Capa acuosa

NaHCO_3 , H_2SO_4 , dilución acuosa, y agua.

Concentración al vacío.

Jarabe 5.5 g. disueltos en 250 ml. de metanol caliente, enfriar.

p.p.

Sobrenadante concentrado al vacío

Jarabe disuelto en 50 ml. de éter

p.p.

Sobrenadante concentrado a 100ml.

añadiendo 1 L. de éter de petróleo
enfriar. S

Substancia aceitosa precipitada, lavada

Sobrenadante

con pequeños volúmenes de éter de petróleo,

disolución en 300 ml. de CCl_4 , caliente, enfriar.

Masas precipitadas

Sobrenadantes concentrados en vacío
a sequedad.

Aceite ligeramente amarillento

6.6 g., 145 u/ml.

Contador de distribución de corriente.

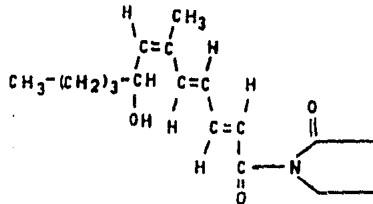
Aceite incoloro 166 u/ml.

TABLA DE SOLUBILIDADES

Cantidad relativa de disolventes en mililitros para 1 gramo ó 1 milímetro.

Muy soluble	Menos de 1 ml.	
Francoamente soluble	de 1 ml.	10 ml.
Soluble	de 10 ml. a	30 ml.
Escasamente soluble	de 30 ml. a	100 ml.
Ligeramente soluble	de 100 ml. a	1 000 ml.
Muy ligeramente soluble	de 1 000 ml. a	10 000 ml.
Practicamente insoluble	más de	10 000 ml.

3.4.4. FORMULA DESARROLLADA.



3.4.5. Descripción.

Se presenta como un aceite neutro incoloro o ligeramente amarillento con olor a éster.

No muestra punto de ebullición definido o punto de descomposición a la presión atmosférica, es gradualmente incoloro a 105°C, pero a altas temperaturas cambia o se vuelve obscuro con descomposición.

La variotina es inestable y pierde gradualmente su actividad fungicida en el desecador; aunque en solventes orgánicos es claramente estable, es muy inestable en condiciones alcalinas.

La variotina es ligeramente soluble en agua, éter de petróleo y ligroina; pero fácilmente soluble en varios solventes orgánicos como:

Metanol, etanol, butanol, alcohol amílico, acetona, acetato de etilo, acetato butílico, metil butil cetona, benceno, éter, cloroformo, tetracloruro de carbono, disulfuro de carbono, éter de bencilo, piridina, dioxano, ciclo hexanol, glicerol, etilenglicol y ácido acético.

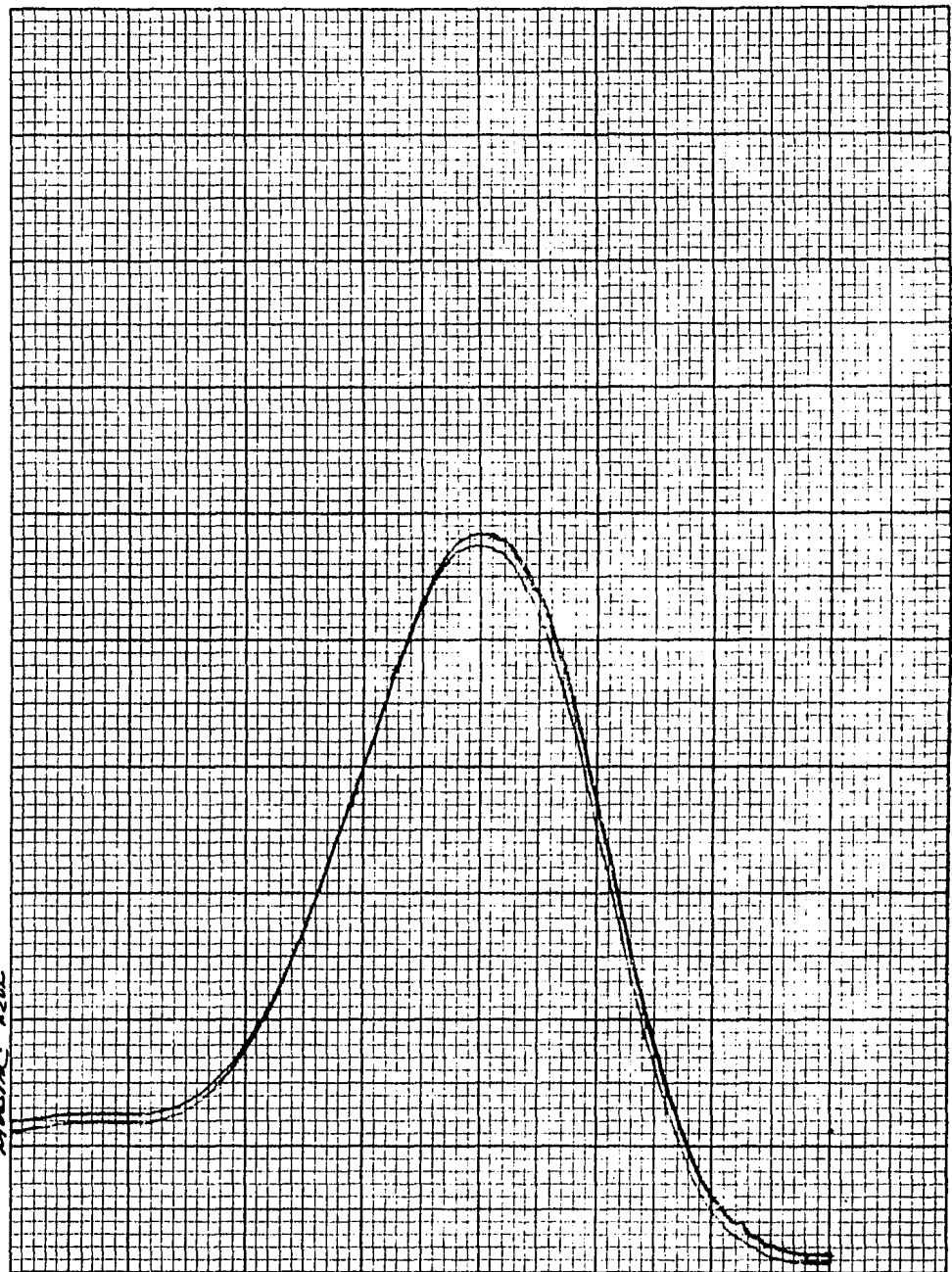
3.4.6. Absorción al Ultravioleta.

El espectro de absorción al Ultravioleta en metanol es de 318 - 324 nm.

SCAN SPEED: 20 mμ/min
PERIOD: 1 sec/min
DATE: 2-17-51
ANALYST: C.C.O.

REF: 1660N
SCALE: 2A

SAMPLE: Karsiolamine
Vial: 81
Soln: Bolo
Solvent: Azul



UV
VIS
300 350 400 450 500 550 600 650 700 750
WAVELENGTH IN nm

$$E_{1 \text{ cm.}}^{1\%} = 1198$$

3.4.7. El espectro de absorción al infrarrojo.

Tiene bandas de absorción en :

3460, 3100, 2950, 2880, 1740, 1670, 1600, 1486, 1430, 1350, 1310, 1260, 1190, 1160, 1125, 1075, 1065, 1025 1005, 970, 935, 885, 865, 840, 800, y 715 cm^{-1} .

Son sugeridos la presencia de grupos ésteres e hidroxilos y dobles ligaduras carbón - carbón.

La variotina da reacción positiva para la formación de diazo-nitro-alquil y prueba de formación de ácido hidroxámico.

Da reacciones negativas para cloruro férrico, Million Ehrlich, Sakaguchi, Molish, Biuret, Iantoproteína y prueba de ninhidrina.

La variotina esta exenta de halógenos, azufre, fosforo y cenizas.

Es inestable y su actividad biológica decrece gradualmente si se deja al medio ambiente, aún cuando es bastante estable en solventes orgánicos.

La variotina inhibe el crecimiento de varios hongos pero no de ciertas bacterias y ciertas levaduras.

La mínima concentración necesaria para la inhibición completa contra la serie de microorganismos se muestra en la tabla # 3, algunos hongos como Trichophyton, Epidermophyton, Microsporum, Criptococcus y Blastomyces son muy sensibles a la variotina, algunas cepas de Penicillium, Aspergillus, Rhizopus y Monilia son también sensibles a este antibiótico.

Fig. 4 Infrared absorption spectrum of varjotin

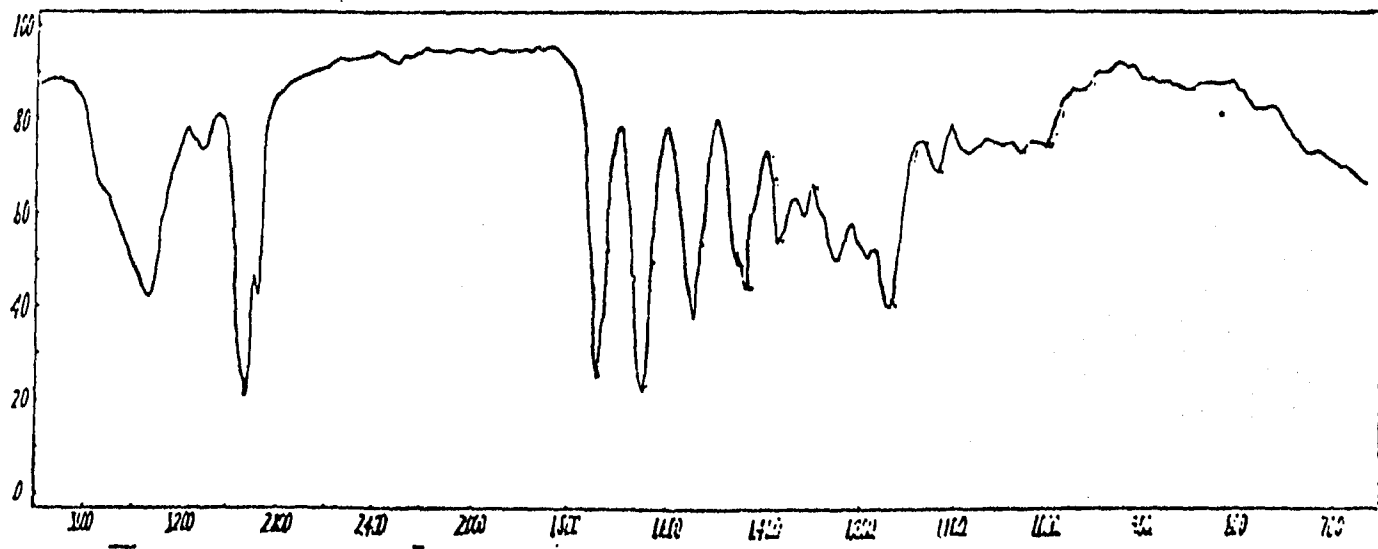


Tabla no. 3

Espectro antimicrobiano de variotina.

Organismo prueba	Medio	Días	Minima concentra ción de varioti- na u/ml.
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	P	7	0.5
<i>Trichophyton tonsurans</i>	P	7	0.13
<i>Trichophyton interdigitale</i>	P	7	0.5
<i>Trichophyton rubrum</i>	P	7	0.25
<i>Epidermophyton inguinale</i>	P	7	0.5
<i>Microsporum audouini</i>	P	18	0.13
<i>Microsporum japonicum</i>	P	17	16.0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	P	7	0.25
<i>Histomyces dermatitidis</i>	P	7	0.06
<i>Candida albicans</i>	P	7	> 160.0
<i>Penicillium chrysogenum</i> Q - 176	C	7	1.0
<i>Penicillium rubrum</i>	C	7	4.0
<i>Penicillium glaucum</i>	C	7	> 160.0
<i>Aspergillus clavatus</i>	C	7	0.6
<i>Aspergillus glaucus</i>	C	7	3.0
<i>Aspergillus orizae</i>	C	7	> 160.0
<i>Aspergillus niger</i>	C	7	> 160.0
<i>Aspergillus japonicus</i>	C	7	> 160.0

P - Medio de glucosa - peptona (glucosa al 1 % - peptona al 1 %), ajustado a un pH = 6,0 incubado a 25°C.

C - Medio de Czapek - caldo (fuente de carbono: sacarosa al 3 % ajustado a un pH = 6.0, incubado a 25°C.

Continuación de la tabla no. 3
Espectro antimicrobiano de variotina.

Organismo prueba	Medio	Días	Minima concentración de variotina u/ml.
<i>Rhizopus javanicus</i>	C	7	0.8
<i>Rhizopus nigricans</i>	C	7	> 160.0
<i>Rhizopus japonicus</i>	C	7	> 160.0
<i>Rhizopus delamer</i>	C	7	5.0
<i>Macor mucedo</i>	C	7	> 160.0
<i>Monilia formosa</i>	C	7	1.0
<i>Saccharomyces cereviceae</i>	P	2	> 160.0
<i>Saccharomyces sake</i>	P	2	> 160.0
<i>Zygosaccharomyces sahsus</i>	P	2	> 160.0
<i>Torula utilis</i>	P	2	> 160.0
<i>Torula rubra</i>	P	2	> 160.0
<i>Torula delbruckii</i>	P	2	> 160.0
<i>Pichia miyaji</i>	P	2	> 160.0
<i>Willia anomala</i>	P	2	> 160.0
<i>Staphylococcus pyogenes</i> var. aureus 209 P	B	1	> 160.0
<i>Escherichia coli</i>	B	1	> 160.0
<i>Bacillus subtilis</i>	B	1	> 160.0
<i>Mycobacterium</i> sp 607	G.C.	7	> 160.0

B - Medio de glucosa - peptona (igual que P, ajustado a pH = 7.0 incubado a 37°C.

G.C. - Medio de Czapek - glicerina (fuente de carbono: glicerina al 3 %), ajustado a un pH = 7.0 incubado a 37°C.

Todas las cepas productoras de tricofitiasis de la piel tienen confirmada su sensibilidad.

3.4.8. ACTIVIDAD DEL ANTIBIOTICO VARIOTINA.

Los estudios sobre los agentes fungicidas han sido realizados por varios investigadores y muchas sustancias fungicidas se comprobaron en dermatomycosis; aunque solo algunos antibióticos fueron aplicados a hongos patógenos internos.

Para probar la actividad de la variotina se utilizaron en total 37 cepas incluyendo 19 hongos patógenos de animales, 7 bacterias patógenas y 11 hongos fitopatógenos como se indica en la tabla # 4.

A partir de la sustancia patrón de referencia se preparó una solución en alcohol etílico al 75 % cuya concentración final fue de 800 u/ml. (v/v), 0.4 ml. de diluciones seriadas de ésta se vaciaron en cajas Petri a las cuales se le agregaron 20 ml. de agar fundido, mezclándolas y dejándolas solidificar.

Una asada del microorganismo prueba de 24 horas de cultivo a 37°C en agar nutritivo fue suspendido en 10 ml. de solución salina estéril. (en hongos y levaduras fue una asada en 1 mililitro de solución salina estéril), colocándose una asada de esta suspensión en línea sobre el medio de agar conteniendo variotina, se incubó a 37°C por 48 horas y se procedió a observar la dilución máxima para la inhibición del crecimiento (para hongos y levaduras se incubó a 27°C por 3, 5, 7 días y 2 semanas).

Tabla no. 4

Actividad de variotina contra hongos fitopatógenos.

Organismo prueba	Medios	Días	Mínima concentración de Vario- tina en u/ mililitros.
<i>Fusarium bulbigenum</i>	G.P.	8	10 ~ 100
<i>Ceratostomella fimbriata</i>	G.P.	8	3.0
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	G.P.	8	0.2 ~ 1.2
<i>Phytophthora infestans</i>	G.P.	8	20.0 ~ 160.0
<i>Alternaria bataticola</i>	G.P.	8	20.0 ~ 160.0
<i>Ophiobolus graminis</i>	G.P.	8	0.2 ~ 1.2
<i>Colletotrichum oingulata</i>	G.P.	8	1.2 ~ 2.0
<i>Colletotrichum tindemuthianum</i>	G.P.	8	20.0 ~ 100.0
<i>Endothia parasitica</i>	G.P.	8	20.0 ~ 160.0
<i>Rosellinia necatri</i>	G.P.	8	20.0 ~ 160.0
<i>Gibberella fujikuroi</i>	G.P.	8	1.2 ~ 20.0

G.P. - Agar de papa - glucosa, ajustado a un pH = 6.0, incubado a 25°C.

Continuación de la tabla no.4

Actividad antibacteriana de variotina contra bacterias patógenas.
(método de placa).

Microorganismo prueba	Variotina
Micrococcus pyogenes var. aureus FDA 209 P	1.0 X 10 ⁴
Escherichia coli	1.0
Bacillus subtilis P C 1 219	1.0
Pseudomona aeruginosa	1.0
Salmonella paratyphi A	1.0
Shigella dysenteriae	1.0
Micrococcus pyogenes var. aureus resiste <u>n</u> te a la penicilina	1.0

Continuación de la tabla no. 4

Actividad antifúngica de variotina contra hongos patógenos de animales.

Organismo prueba	variotina	
	Mínima dilución inhibitoria $\times 10^4$.	Mínima concentración inhibitoria u/ml.
<i>Candida albicans</i>	1.0	16.0
<i>Candida tropicalis</i>	1.0	16.0
<i>Candida pseudotropicalis</i>	1.0	16.0
<i>Candida krusei</i>	1.0	16.0
<i>Candida parakrusei</i>	1.0	16.0
<i>Candida stellatoidea</i>	1.0	16.0
<i>Candida guilliermondi</i>	1.0	16.0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	64.0	0.25
<i>Nocardia asteroides</i>	1.0	16.0
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	256 .0	0.063
<i>Geotrichum</i> sp	1.0	16.0
<i>Sporotrichum schenoki</i>	4.0	4.0
<i>Horodendrum pedrosi</i>	32.0	0.5
<i>Trichophyton mentagrophyte</i>	32.0	0.5
<i>Trichophyton tonsurans</i>	128.0	1.025
<i>Microsporium audouini</i>	128.0	0.125
<i>Microsporium canis</i>	16.0	1.0
<i>Epidermophyton inguinale</i>	32.0	0.5
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.0	16.0

Cepas: Universidad de Duke (método de placa).

La actividad antimicrobiana fue representada por la concentración que tuvo la mínima inhibición en u/ml.

RESULTADOS EXPERIMENTALES.

Variotina tiene una actividad de antibiótico fuerte sobre dermatofitos como son Trichophyton, Epidermophyton y también en micosis internas como son Blastomyces y Criptococcus; pero también presenta una actividad débil sobre Geotrichum, Nocardia, Aspergillus, y Candida, el espectro antibiótico de variotina es similar con el de tricomicina, nistatina y anfotericina y otros antibióticos polienos que tienen fuerte actividad sobre Candida albicans.

En bacterias patógenas la variotina fue inefectiva en diluciones de 1×10^4 ó menos. En hongos fitopatógenos variotina tuvo efectividad sobre Chaetomium globosum, Gladosporum cucumerinum, Glomerella singulata, Penicillium italicum, Klinoe fawcettii pero inefectiva sobre Alternaria kikuchiana, Rhizopus nigricans.

3.4.9. ESTABILIDAD DE VARIOTINA.

1.- Como se muestra en la tabla # 5 la variotina por sí misma es inestable pero es más estable cuando se substituye el aire por un gas inerte como nitrógeno, la variotina es descompuesta aparentemente por oxidación.

2.- Estabilidad de variotina disuelta en solventes orgánicos.

La estabilidad de la solución de variotina conteniendo 800 u/ml., en varios solventes orgánicos fue probada.

Tabla # 5

Estabilidad de la variotina en el aire y el nitrógeno.

Gas conectado	Temperatura	
	5°C	37°C
Nitrógeno	68 %	27 %
Aire	49 %	20 %

Las cifras representan % de actividad después de 30 días.

En la tabla # 6 se indican los grados de la potencia que permanece después de aumentar la temperatura a 37° C, por 30 días.

La variotina es más estable en cetonas, enseguida en ésteres bajamente inestable en alcoholas y completamente inestable en tetracloruro de carbono, la estabilidad fue un poco más alta en alcohol etílico al 75 % - que en alcohol puro, en alcohol al 75 % se produjo un ácido cuando la variotina se descompuso y dió reacción positiva a la formación de ácido hidroxámico, haciendo se negativa después de la descomposición, estos factores sugirieron que la descomposición fue causada por - la ruptura de la ligadura éster.

3.- Estabilidad de variotina en alcohol al 75 %.

La influencia del pH y los efectos de varios agentes estabilizantes fueron examinados por la tabla ortogonal de clasificación $L_{16} (2^{15})$, usando 8 000 u/ml. de variotina en alcohol etílico al 75 %.

La potencia que permaneció fue determinada después - de aumentar la temperatura a 37°C por 30 días. Los resultados fueron analizados y presentados en la tabla # 7. Los valores que permanecieron altos fueron 48 a pH= 6.55 - 7.0, a pH de 5.0 - 5.65, fueron altos 4.6 y 8.4 %, cuando se agregó 0.05 % de E.D.T.A. y 0.05 % de --- hidroxianizol butilado respectivamente igual que al -- control.

La adición de bisulfito de sodio y tiourea fue más ó menos efectiva.

Tabla no. 6

Estabilidad de variotina en solventes orgánicos después de 30 días a 37 °C.

Solventes	Porcentaje de actividad residual.
Alcohol	45
Alcohol etílico al 75 %	55
Isopropanol	60
Etil acetato	95
Butil acetato	91
Acetona	100
Metil isobutil cetona	100
Tetracloruro de carbono	menor de 40

Concentración inicial : 8 000 unidades / mililitro.

La relación entre la concentración y la estabilidad de la variotina en alcohol etílico al 75 % fueron probados con 8 lotes de preparaciones. Los valores de la potencia que permaneció sobre el promedio se muestra en la tabla # 7, la variotina fue más estable en bajas concentraciones permaneciendo alto el valor de la potencia.

4.- Estabilidad de la loción tópica de variotina a diferentes temperaturas.

Una muestra de loción de variotina que contenía 800 unidades / mililitro, 1.0 gramo de cloruro de benzalco nio, 0.05 mililitros de metilsalicilato, 0.2 mililitros de propilenglicol y 0.1 mililitros de E.D.T.A. como agente estabilizante en 1.0 mililitro de alcohol al 75 % y aumentada la temperatura de 25° a 37°C, la actividad permanente se muestra en la tabla # 8, al analizar los datos de 27 casos.

5.- Estabilidad de variotina en polietilenglicol.

La prueba de un ungüento conteniendo 800 unidades / gramo de variotina en polietilenglicol como base fue preparado y la influencia del pH, calidad de la base del ungüento y los efectos de varios agentes estabilizantes fueron examinados por la tabla ortogonal ya mencionada.

En las muestra se aumentó la temperatura a 50°C por 30 días y el valor de la potencia que permaneció fue analizado como se indica en la tabla # 9, el valor alto de esta potencia fue de 66 % a pH de 4.0 - 5.0 que a pH de 6.0, se obtuvo 10.26 % más alto que el con --

Tabla no. 7

Efectos de algunos factores sobre la estabilización de variotina 8 000 u/ml. Disuelta en alcohol etílico al 75 %, después de 30 días a 37°C, el porcentaje de la actividad restante fue analizada.

Factores	Nivel 1	Efectos factoriales %			Nivel 2
pH	5.0 - 5.65	- 2.4		+ 2.4	6.35 - 7.0
E.D.T.A.	0.05 %	+ 2.3	⊕	- 2.3	0.01 %
pH	5.0 - 6.35	- 0.1		+ 0.1	5.65 - 7.0
Metabisulfito de sodio	0 %	- 1.0		+ 1.0	0.05 %
Hidroxianizol butilado	0.05 %	+ 4.2	⊕	- 4.2	0 %
Tiourea	0 %	- 1.6		+ 1.6	0.05 %

Promedio = 90.8 %

⊕ = 5.2 %
 ⊕: F (0.05)
 ⊕: F (0.01)






Tabla no. 8

Estabilidad de la loción tóptica de variotina, porcentaje de actividad restante.

Temperatura	M e s e s						
	1	2	4	6	7	8	9
25°C	-	-	-	100	93	94	98
37°C	96	100	104	85	88	84	97


Tabla no. 9

Efectos de algunos factores sobre la estabilización de unguento de variotina (800 u/gramo) en polietilenglicol. El porcentaje de actividad restante se analizó después de 30 días a 50°C.

Factores	Nivel 1	% efectos factoriales			Nivel 2
pH	6.0.	+ 3.30		 - 3.3	4.0 - 5.0
pH	4.0	- 0.90		+ 0.90	5.0
Tiourea	0.01 %	+ 5.13		- 5.3	0 %
Polietilenglicol	Producto de U. Co.	+ 2.05		- 2.05	Producto de S. de Co.
Hidroxianisol butilado	0.01 %	+ 1.38		-1.38	0 %
Metabisulfito de sodio	0 %	- 3.31		 + 3.31	0 %
Butilhidroxitoluol	0 %	- 0.96		+ 0.96	0.01 %
Propilgalato	0 %	- 5.75		 + 5.75	0.015 %
E.D.T.A.	0.10 %	+ 0.65		- 0.65	0 %

Promedio = 96.0 %

σ = 5.0 %

 : F (0.01)

trol cuando se añadió 0.01 % de tiourea.

La adición de 0.05 % de metabisulfito de sodio y --- 0.01 % de propilgalato incrementó el valor de 6.62 % a 11.5 % respectivamente; aunque no hay diferencias significativas, el pH de 4.0 fue mejor que el pH de 5.0, la adición de hidroxianizol butilado, butilhidroxitolueno, o E.D.T.A. fueron más o menos efectivos.

6.- La estabilidad del ungüento de variotina se muestra en la tabla # 10, la formulación fue examinada después de incrementar la temperatura de 25° a 37°C. Los resultados mostrados en la tabla nos indican potencias no bajas en 3 semanas.

Concluyendo: la variotina es por si misma una sustancia inestable; pero es más estable en soluciones hechas con solventes orgánicos.

Los solventes que estabilizan a la variotina son en el siguiente orden: cetonas, ésteres, y alcoholes. Se obtienen mejores resultados con alcohol al 75 % que con alcohol puro.

En alcohol al 75 % se prefiere un pH de 6.0 - 7.0 y el E.D.T.A o el hidroxianizol butilado tienen excelentes efectos estabilizantes.

El ungüento de variotina en base de polietilenglicol es más estable a un pH de 4.0; la tiourea, el metabisulfito de sodio o el propilgalato son excelentes agentes estabilizantes.

Tabla no. 10

Relación entre las estabilidades y concentraciones de variotina en alcohol al 75 %

Porcentaje de actividad permanente a 37°C.				
	1a. semana	2da. semana	3a. semana	4a. semana
8 000 u/ml.	79	69	54	-
1 600 u/ml.	-	98	92	50
800 u/ml.	-	98	95	85

3.4.10 USOS.

La incidencia como la variedad de formas clínicas en las dermatomycosis, dan lugar a diferentes tipos de interpretaciones en el diagnóstico y sobre todo en las medidas terapéuticas a seguir.

Dermatomycosis, dermatofitias o tinea, son micosis cutáneas producidas por los géneros Tricofitón, Epidermofitón, Microsporia, y Queratinomicos, que se reúnen bajo el nombre común de dermatofitos, los que por no reproducirse por un proceso sexual característico están incluidos en el grupo de los hongos imperfectos.

La palabra tinea (del Latín tinea = polilla) es un nombre genérico aplicado a varias enfermedades causadas por diversas clases de hongos parásitos que afectan la piel y sus anexos.

Desde el punto de vista terapéutico las fórmulas destinadas a tratar las tineas deben de tener una acción fungistática y sobre todo fungicida, con gran poder de penetración en la capa córnea para entrar en contacto con las esporas y los micelios, acompañándose la sustancia activa de un vehículo apropiado que tenga acción bactericida; ya que a veces hay infecciones secundarias sobregregadas, dicho vehículo no debe producir irritación tisular, sensibilidad o antigenicidad.

La variotina está indicada en el tratamiento de las distintas formas de tineas producidas por dermatofitos que comúnmente afectan la piel, mucosas, pelos y uñas, pie de atleta, (tinea pedis), tinea cruris, -

tinea corporis, tinea imbricata, tinea inguinalis, tinea versicolor, tinea barbae, tinea capitis y no se reduce su acción por la presencia de sangre, pus o suero en la lesión.

Está contraindicada en las lesiones de tuberculosis en la piel, herpes simple, vacunas y varicela.

3.4.11. EFECTOS SECUNDARIOS.

Farmacológicamente no provoca reacción local apreciable al ser aplicado a la piel, ni produce efectos notorios sobre la función adrenal, como tampoco influye en el peso somático.

A veces puede haber ligera alteración en el hemograma, tiene además acción colinérgica sobre el sistema nervioso autónomo, lo cual se reduce en intensidad por una aplicación continua sobre el músculo, ejerce acción anestésica o a veces antibiótica a niveles más altos; a ello se debe que la aplicación continua de variotina cause menor efecto tóxico.

La potencia de variotina se expresa en unidades.

" Una unidad es la cantidad mínima de variotina necesaria para inhibir completamente el crecimiento de 1 mililitro de *Penicillium chrysogenum* ATCC 10 002 en un medio de cultivo especial.

Las fórmulas farmacéuticas que se han desarrollado y cuyo principio activo es la variotina son: loción y unguento.

A continuación se presentan algunas fórmulas de ellos.

Loción de variotina.

Variotina concentrada	800 u/ml.
Alantoína	
Cloruro de benzalconio	
Hidroxianisol butilado	
E.D.T.A. USP	
Propilenglicol USP	
Alcohol etílico 96 %	
Agua destilada.	

Ungüento de variotina

Variotina concentrada	1 000 u/ml.
Cloruro de benzalconio	
Agua destilada	
Hidroxianisol butilado	
E.D.T.A. USP	
Poli-etilenglicol USP 400	
Poli-etilenglicol USP 4 000	

En las dos fórmulas presentes se ha comprobado el gran poder de penetración del antibiótico, la loción en cuya fórmula lleva alantoína, la cual es un agente queratolítico, ayuda a permeabilizar la capa córnea de la piel.

La presencia del cloruro de benzalconio en ambas fórmulas les proporciona poder antibacteriano.

IV.- PARTE EXPERIMENTAL.

4.1. METODO DE PRUEBA.

Determinación de la potencia de variotina por el método microbiológico en placa utilizando *Penicillium chrysogenum* ATCC 10 002.

Medio de cultivo utilizado.

Czapek - Dox agar cuya composición es la siguiente en-gramos/ litro.

Sacarosa	30.0 gramos
Nitrato de sodio	3.0 "
Sulfato de magnesio	0.5 "
Cloruro de potasio	0.5 "
Sulfato de plomo	0.01 "
Fosfato dibásico de potasio	1.0 "
Agar - agar	13.0 "

Disolver 48 gramos en un litro de agua destilada y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

pH del medio listo para su uso a 30°C es de 7.3 ± 0.1 .

Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH = 6.0

Fosfato monobásico de potasio	11.7 gramos
Fosfato dibásico de sodio dedeca hidratado	5.1 "
Agua destilada c.b.p.	1 000 mililitros.

Si es necesario, ajústese el pH a 6.0 con solución de hidróxido de potasio 10 N o ácido fosfórico 16 N.

4.2. Microorganismo utilizado en la determinación.

Se utilizó la cepa de Penicillium chrysogenum ATCC - 10 002.

4.3. Preparación del inóculo.

a) Preparar un cultivo de esporas sembrando Penicillium chrysogenum ATCC 10 002 en un tubo con agar -- Czapek inclinado, incubar durante 7 días a 25°C, al cabo de los cuales se recogen las esporas con 10 --- mililitros de solución salina estéril, pasando estas esporas a una botella Roux conteniendo aproximadamente 300 mililitros del mismo medio de cultivo estéril inclinado y solidificado.

b) Incubase la siembra anterior durante 7 días a 24°-27°C.

c) Cosechar con ayuda de perlas de vidrio estériles -- las esporas resultantes con 50 mililitros de agua destilada estéril conteniendo 0.05 % de polisorbato.

d) Ajustar la suspensión de esporas a un contenido de alrededor de 10^6 - 10^7 esporas por mililitro.

Utilizando para ello un nefelómetro o bien por medio de una cuenta bacteriana haciendo las diluciones que sean necesarias.

En este caso particular se encontró que eran necesarios 2 mililitros de la suspensión de esporas cosechadas directamente de la botella Roux para cada 100 mililitros de agar Czapek (capa semilla).

4.4. Preparación de las placas.

- a) Distribuir horizontalmente 21 mililitros de agar - Czapek fundidos a cajas Petri de 20 x 100 mm.
- b) Cubrir las cajas con tapas apropiadas, como de porcelana vidriada y dejar endurecer el medio, correspondiendo ésto a la capa base.
- c) Preparar la capa semilla agregándole la cantidad de suspensión de esporas apropiada a cada 100 mililitros de agar Czapek fundido y enfriado a 48°C, mezclar el inóculo con el agar cuidadosamente y agréguese 4 mililitros de esta a cada una de las placas que contienen los 21 mililitros de agar solidificado.

Muévanse las cajas de delante hacia atrás o bien en forma circular para distribuir uniformemente el agar - inoculado en la base de agar, solidificado.

- d) Colóquense 6 cilindros de acero inoxidable, de diámetro interno de 6 milímetros, estériles sobre la superficie del agar inoculado a intervalos de 60° y en radios de 2.8 centímetros.

4.5. Preparación de la solución patrón. (tipo) de Variotina

Patrón: el termino patrón de Variotina (variotina - Master Standar), significa un lote específico de variotina disuelta en alcohol etílico al 75 %, y adicionado de E.D.T.A. a una concentración de 0.01 % que contiene 800 unidades / mililitro de variotina, designada por el Instituto Nacional de salud del Japón como el patrón de comparación para la determinación de la potencia para el ensayo.

El término una unidad, " significa la cantidad de variotina contenida en un mililitro de la misma concentración, que inhibe completamente el crecimiento de *Penicillium chrysogenum* ATCC 10 002 ".

4.6. Preparación de la curva tipo.

Preparar la curva tipo usando concentraciones de la solución patrón de variotina para tener: 0.64, 0.80, 1.0 (punto de referencia), 1.25 y 1.56 unidades / mililitros. Diluyéndolas con solución amortiguadora de fosfatos pH = 6.0

A continuación se presenta una tabla que nos ejemplariza como llegar a estas concentraciones partiendo de -- una solución patrón de variotina que contiene 10 unidades / mililitro. Si de esta solución tomamos:

	Solución amortiguadora.	concentración.
15.6 mililitros c.b.p.	100 ml.	1.56 U/ml.
12.5 " " "	100 ml.	1.25 "
10.0 " " "	100 ml.	1.0 "
8.0 " " "	100 ml.	0.80 "
6.4 " " "	100 ml.	0.64 "

4.7. Preparación de las muestras.

Ungüento de variotina conteniendo 1 000 unidades por -- gramo.

1.- Pesar un gramo de unguento y transferirlo a un matraz erlenmeyer de 250 mililitros, con tapón esmerilado.

- 2.- Añadir 5.0 mililitros de ligroina y mezclar hasta que se disuelva el unguento.
- 3.- Añadir 100 mililitros de la solución extractiva - (etanol absoluto - amortiguadora de fosfatos pH = 6.0 1:1, v/v) , y mezcle bien.
- 4.- Después que la fase acuosa se ha separado, diluir - una porción de ésta a tener una unidad por mililitro -- con solución amortiguadora de fosfatos pH = 6.0, procediéndose a ensayar. (En este caso se toman 10 mililitros y se llevan a 100 mililitros con solución amortiguadora de fosfatos pH = 6.0 teniendo finalmente 1.0 - u/ml.

4.8. Loción de variotina conteniendo 800 unidades / mililitro.

Diluir una porción conveniente para tener una unidad por mililitro, en este caso cada mililitro de loción-- contiene 800 unidades / mililitro se toman 12.5 mililitros de loción se llevan a 100 mililitros con solución amortiguadora de fosfatos pH= 6.0, obteniéndose la solución A.

Tomar de la solución A 1.0 mililitro y llevar a 100 -- mililitros con solución amortiguadora de fosfatos pH = 6.0, obteniéndose una concentración final de una unidad por mililitro.

4.9. Procedimiento para el ensayo.

- 1.- En cada una de tres placas, llene tres cilindros - con cada concentración y llene los otros tres cilindros de todas las placas con la concentración de una-

unidad por mililitro.

Así quedaran 36 cilindros con esta última concentración y 9 cilindros con cada una de las concentraciones restantes.

Incubar las placas durante 48 horas a 25°C.

Medir el diámetro de cada halo de inhibición aproximándose a décimas de milímetro, usando un proyector adecuado.

Promediar las lecturas de la concentración de una unidad por mililitro y las lecturas de cada punto en cada grupo de tres placas y promedie también las 36 lecturas de la concentración de una unidad por mililitro.

Este promedio es el punto de corrección de la curva.

Corregir el valor promedio obtenido en cada concentración, si las lecturas de la concentración de una unidad por mililitro en ese grupo de placas no fueran iguales al punto de corrección; por ejemplo, si se trata de corregir la concentración de 0.80 unidades por mililitro, se tiene que el promedio de las lecturas de las concentraciones de los 36 cilindros de una unidad por mililitro (punto de corrección), es de 18 milímetros y que el promedio de esta misma concentración en el grupo de 3 placas de 0.80 unidades por mililitro es de 17.8 milímetros, la corrección será de 0.2 milímetros, si el promedio de las lecturas de la concentración de 0.80 unidades por mililitro es de 15 milímetros el valor corregido será de 15.2 milímetros.

Graficar los valores, incluyendo el promedio de las -

36 lecturas de una unidad por mililitro en papel semi logarítmico de dos ciclos, colocándose las concentraciones en unidades por mililitro, como ordenadas y el diámetro de las zonas de inhibición en milímetros como abscisas.

$$L = \frac{3A + 2B + C - E}{5}$$

$$H = \frac{3E + 2D + C - A}{5}$$

L - Es el diámetro corregido de la concentración más baja de la curva.

H - Es el diámetro corregido de la concentración más alta de la curva.

C - Es el diámetro promedio de las 36 lecturas de la concentración de una unidad por mililitro.

A, B, D, E, son los promedios corregidos de las lecturas de las concentraciones de 0.64, 0.80, 1.25, y 1.56 unidades por mililitro respectivamente.

Procedimiento para el ensayo de la muestra.

Emplear tres placas para cada muestra de ensayo (y 3 más para cada muestra adicional), llenar tres cilindros de cada placa con la solución patrón correspondiente a una unidad por mililitro y tres cilindros con la muestra cuya concentración teórica es de una unidad -- por mililitro, alternándolas.

Incubar las placas durante 48 horas a 25°C y medir el diámetro de cada halo de inhibición, aproximando a décimas de milímetro utilizando un proyector adecuado. Para calcular la concentración de la muestra promediar

las lecturas de la dilución intermedia patrón y las lecturas de la muestra.

- a) si la muestra da un promedio de diámetro mayor que el promedio del patrón agregar la diferencia entre ellos al valor de una unidad por mililitro en la curva.
- b) Si el valor del promedio de la muestra es menor que el valor del patrón reste la diferencia entre ellos, del valor de una unidad por mililitro.
- c) De la curva, leer las concentraciones correspondientes a los valores corregidos de las zonas y determinar la potencia utilizando el factor de dilución.

El método descrito anteriormente fue proporcionado por la casa matriz productora del antibiótico fungicida, el cual al ser desarrollado en el laboratorio de control de calidad de los laboratorios en los que se efectuó este trabajo, le fueron hechas pequeñas modificaciones de acuerdo al sistema ya implantado y validado para la determinación interna en la valoración microbiológica de antibióticos; siguiendo desde luego las legislaciones vigentes, el trabajo se realizó de la siguiente manera:

- 1.- Medio de cultivo utilizado: Czapek Dox agar con la misma concentración descrita anteriormente.
- 2.- Solución amortiguadora utilizada en la prueba.

Solución amortiguadora de fosfatos pH = 6.0 cuya preparación ya se describió.

- 3.- El microorganismo prueba utilizado en la determina

ción fue *Penicillium chrysogenum* ATCC 10 002.

4.- Preparación del inóculo.

Preparado de la misma manera que marca el método descrito anteriormente.

5.- Preparación de las placas.

a) Distribuir 21 mililitros de agar Czapek fundido en 10 cajas Petri estériles, 6 cajas corresponderán a la curva patrón y 4 cajas para el problema, poniendo 4 cajas más por cada problema adicional, dejar solidificar (capa base).

b) Agregar la cantidad apropiada de la suspensión de esporas ya ajustadas para cada 100 mililitros de agar Czapek previamente fundido y enfriado a 48°C (2 mililitros de la suspensión de esporas tomadas directamente de la botella Roux).

c) Mezclar al inóculo con el agar cuidadosamente y agregar 4 mililitros de esta mezcla a cada placa conteniendo los 21 mililitros de agar sin inocular y solidificado, moviendo en forma circular para distribuir uniformemente el agar inculado, en la base de agar.

d) Colocar 6 cilindros estériles de acero inoxidable de diámetro interno de 6 milímetros en la superficie del agar inculado a intervalos de 60° y en radios de 2.8 centímetros empleándose para ello un colocador de cilindros.

6.- Preparación de la solución patrón de variotina.

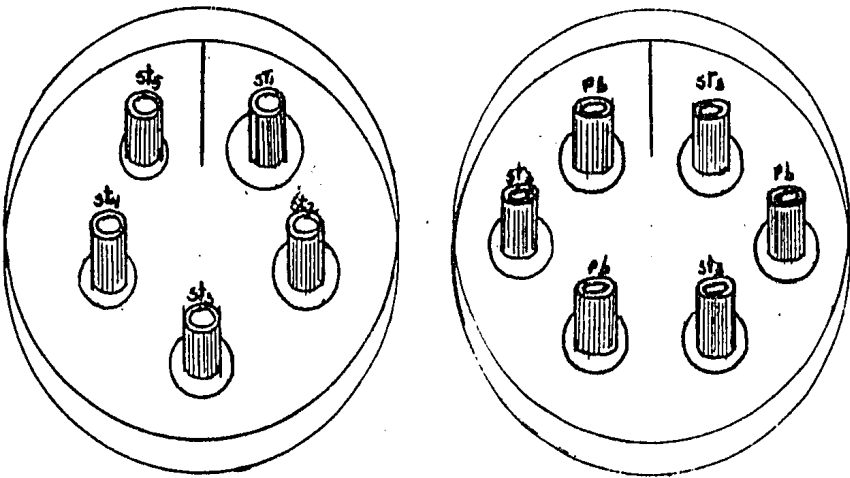
La preparación fué hecha como se indica en el inciso 4.3.

7.- Preparación de la curva tipo.

La preparación se realizó de la misma manera ya anotada anteriormente, así como la preparación de las -- muestras.

8.- Procedimiento para el ensayo.

En cada una de las 6 placas llenar 5 cilindros con -- cada una de las concentraciones (1.56, 1.25, 1.0 ó -- concentración intermedia, 0.80, 0.64 unidades por -- mililitros) como se esquematiza enseguida.



En las cuatro cajas restantes alternando, llenar tres cilindros con la solución patrón correspondiente a -- una unidad por mililitro y tres cilindros con la muestra cuya concentración teórica es de una unidad por mililitro.

Incubar las placas durante 48 horas a 25°C y medir el diámetro de cada halo de inhibición, aproximando a décimas de mililitro utilizando en este caso un medidor de halos de inhibición.

Promediar las lecturas de la concentración de una unidad por mililitro en el grupo de 6 placas y las lecturas de cada punto en las mismas que corresponden a A, B, D, y E.

Aplicar las fórmulas siguientes:

$$L = \frac{3A + 2B + C - E}{5}$$

$$H = \frac{3E + 2D + C - A}{5}$$

L - Es el diámetro corregido de la concentración más baja de la curva.

H - Es el diámetro corregido de la concentración más alta de la curva.

C - Es el diámetro promedio de las concentraciones leídas en una unidad por mililitro.

A, B, D y E son los promedios corregidos de las lecturas de las concentraciones de 0.64, 0.80, 1.25, 1.56 - unidades por mililitro.

Graficar los dos puntos obtenidos en papel semilogarítmico de dos ciclos correspondiendo las ordenadas a las concentraciones en unidades por mililitro, y en las abscisas el diámetro de las zonas de inhibición en milímetros.

Interpolando la concentración de una unidad por mililitro en la gráfica obtenida con los dos puntos anteriores, obtendremos el valor corregido en milímetros de la concentración intermedia.

Promediar enseguida las 12 lecturas obtenidas en las cuatro cajas restantes de la dilución intermedia (una unidad por mililitro) y las 12 lecturas de la solución problema (concentración teórica de una unidad por mililitro), ésto nos servirá para calcular la concentración práctica de la muestra.

De esta manera tendremos:

- 1.- Valor corregido en la curva de una unidad por mililitro de la solución patrón.
- 2.- Promedio de las lecturas de la solución patrón corrida junto con la muestra problema.
- 3.- Promedio de las lecturas de la muestra problema.

Al valor corregido en la curva de una unidad por mililitro de la solución tipo, réstese el promedio de las lecturas de la solución patrón corrida junto con la muestra.

a) si el promedio de las lecturas de la solución patrón corrido junto con la muestra es menor que el valor co-

rrregido en la curva de una unidad por mililitro, la - diferencia se sumará al promedio de las lecturas de - la muestra problema, si es mayor se le restará, de es te modo tendremos el valor corregido para el promedio de las lecturas de la muestra problema; con este dato obtenido en milímetros, lo llevamos a la curva ya tra zada en el papel semilogarítmico de 2 ciclos y extra polando obtenemos el valor de la concentración en uni dades por mililitro de la muestra problema.

Cálculos utilizando el factor de dilución para tener - unidades por miligramo o mililitro.

Unidades/mililitros X 1er. aforo X 2do. aforo = u/mg
Peso mta. en g. ó ml. X 1er. alícuota X 2da. alícuo.

4.10. METODO DE DIFUSION EN PLACA CON DISCOS DE PAPEL.

1.- Discos de papel filtro de 9 milímetros de diáme- tro para la preparación de la curva patrón, así como - para la muestra, se procede de la misma manera que pa- ra el método de difusión en placa con cilindros de ace- ro inoxidable; la única variación es la preparación de los discos de papel para poder efectuar la prueba.

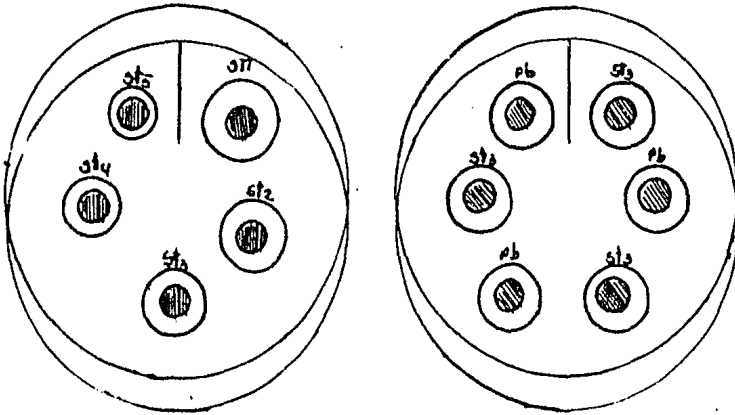
Procedimiento para la curva patrón.

Teniendo las concentraciones de 0.64, 0.80, 1.0 (pun- to de referencia), 1.25, 1.56 unidades por mililitro, preparadas a partir de la solución patrón diluyéndolas con solución amortiguadora de fosfatos pH = 6.0.

Usar 6 placas para correr la curva patrón incluyendo - la de una unidad por mililitro que se usará como punto

de referencia, y se incluirá en cada placa (un total de 10 placas).

En cada una de las 6 placas colocar un sensidisco previamente humedecido con cada concentración en caso -- que sea necesario secar el exceso de humedad antes de colocarlo, procurando que dicho secado sea uniforme -- para todas las concentraciones. (ver esquema)



En las cuatro cajas restantes colocar tres sensibilizadores previamente humedecidos con la solución patrón -- correspondiente a una unidad por mililitro y tres sensibilizadores humedecidos con la muestra cuya concentración teórica es de una unidad por mililitro alternándolos. Incubar las placas durante 48 horas a 26°C. Medir el diámetro de cada halo de inhibición aproximando a décimas de milímetros usando un proyector adecuado.

Promediar las lecturas de la concentración de una unidad por mililitro y las lecturas de cada punto en el grupo de 6 placas.

Hacer las correcciones para la obtención de los dos -- puntos aplicando las fórmulas ya mencionadas, de igual manera como se hizo con el método anterior, graficando en papel semilogarítmico de dos ciclos colocando las -- concentraciones en unidades por mililitro como ordenadas y como abscisas el diámetro de las zonas de inhibición.

Trasar la curva correspondiente, interpolando el promedio de las lecturas de una unidad por mililitro, para tener el valor corregido en milímetros de la concentración intermedia del patrón.

Promediar enseguida las 12 lecturas obtenidas en las -- cuatro placas restantes de la dilución intermedia (una unidad por mililitro) ésto nos servirá para calcular la concentración práctica de la muestra.

Al valor corregido en la curva de una unidad por mililitro de la curva tipo restar el promedio de las lecturas de la misma solución corrida con la muestra.

Si el promedio de las lecturas de la solución patrón, -- corrida junto con la muestra es menor que el valor corregido en la curva, de una unidad por mililitro, la diferencia se sumará al promedio de las lecturas de -- la muestra problema, si es mayor se le restará, teniendo de esta manera el valor corregido para el promedio de las lecturas de la muestra problema, con este dato-

obtenido en milímetros, lo llevamos a la curva ya trazada en el papel semilogarítmico de 2 ciclos; extrapolando obtenemos el valor de la concentración en unidades por mililitro de la muestra problema.

Calcular la potencia en unidades por miligramo utilizando el factor de dilución.

Unidades/mililitro X 1er. aforo X 2do. aforo = u/mg.
Peso mta. en g. ó ml. X 1er alicueta X 2da. alic.

LABORATORIOS DE CONTROL BIOLÓGICO Y QUÍMICO

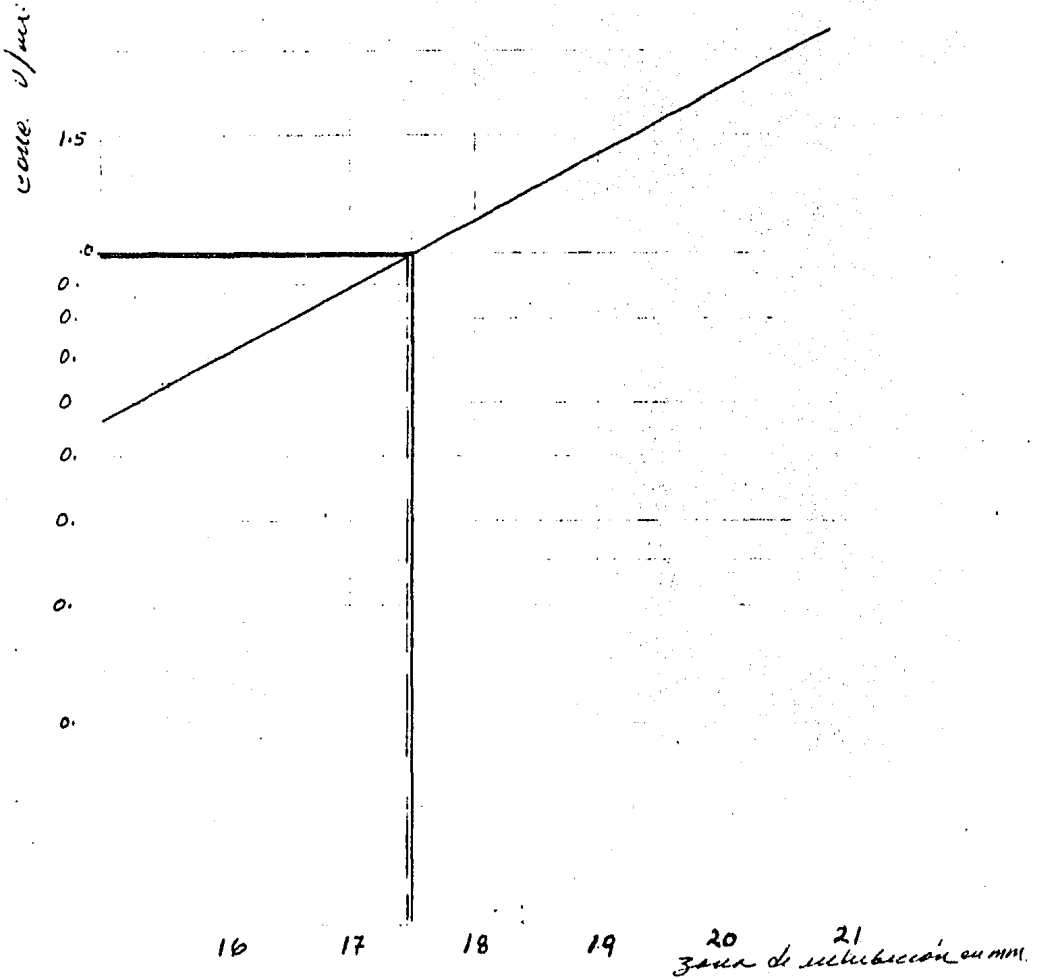
Producto: Varietina
Loción de Varietina
lote K 90133

Fecha _____

Análisis No. _____

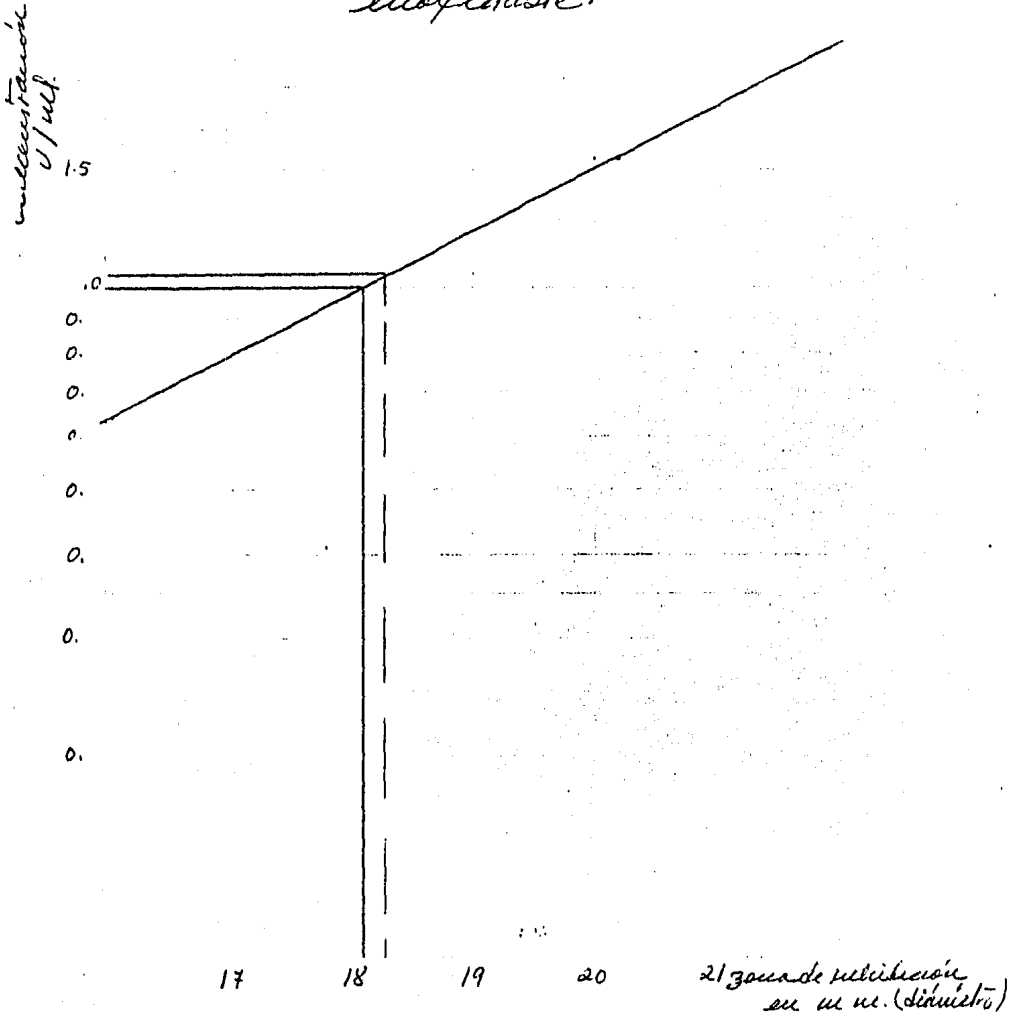
MUESTRA	DILUCION	INHIBICION en mm.						PROMEDIO	CORREC.	U/ml.	TOTAL	OBSERVACIONES	
St1 (B)	1.56 u/ml	19.4	19.6	19.4	19.6	19.4	19.6	19.5	19.44				
St2 (D)	1.25 u/ml	18.2	18.4	18.4	18.4	18.2	18.4	18.33					
St3 (C)	1.0 u/ml	17.6	17.6	17.6	17.6	17.4	17.4	17.53	17.50				
St4 (D)	0.80 u/ml	16.8	16.4	16.6	16.8	16.6	16.4	16.60					
St5 (A)	0.64 u/ml	15.6	15.4	15.4	15.4	15.6	15.6	15.50	15.55				
K = 3A+2B+C-E		= 3(15.5)+2(16.6)+17.53 - 19.5						= 46.5+33.2+17.53 - 19.5	= 97.23 - 19.5	= 77.73 = 15.55			
5		5						5		5		5	
H = 3E+2D+C-A		= 3(19.5)+2(18.33)+17.53 - 15.50						= 58.5+36.66+17.53 - 15.5	= 112.69 - 15.5	= 97.19 = 19.44			
5		5						5		5		5	
St3	1.0 u/ml	17.6	17.4	17.6	17.6								
St3	" "	17.4	17.4	17.6	17.6			17.55					
St3	" "	17.6	17.6	17.6	17.6								
Pb	" "	17.6	17.4	17.4	17.4								
Pb	" "	17.6	17.6	17.4	17.6			17.51	17.46	0.99 u/ml			
Pb	" "	17.4	17.6	17.6	17.6								
corrección:		17.5	- 17.55 = -0.05										
Cálculos:		0.99	x $\frac{100 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} \times 10$				= 990	=	792 u/ml	= 99%			
		1.25	x 1.0 ml				1.25						

Loción de Vasistina
 Método difusión en placa de agar
 Utilizando discos de papel filtro.



Varietina

Vaquero de Varietina lote 700356
 Método de depuración en placa de ayar
 utilizando pericilindros de acceso
 inoxidable.



La finalidad perseguida al realizar el presente trabajo fue la de poder cuantificar la variabilidad biológica del método por difusión en placa de agar por esta razón ha sido realizado en dos etapas diferentes.

1a. Etapa:

En ésta se ha realizado el trabajo práctico sometiendo un mismo lote de unguento de variotina 14 veces consecutivas por el método del cilindro y 12 veces con discos de papel filtro (sensidiscos).

Con la loción de variotina se realizaron 12 análisis de un mismo lote por ambas variantes hechas al método ya mencionado anteriormente.

2a. Etapa:

En ésta se analizaron 32 lotes diferentes de ambas formas farmacéuticas con las dos variantes.

En las tablas que a continuación se muestran, se han agrupado en forma ordenada los resultados prácticos obtenidos en ambas determinaciones.

También se presentan los resultados del análisis estadístico a que fueron sometidos los resultados prácticos obtenidos.

Lo cual nos permitió no solamente cuantificar la variabilidad del método biológico, sino que nos señaló asociaciones, significaciones o parámetros que ampliaron nuestro horizonte de comprensión, todo dentro del marco de la probabilidad.

V.- Resultados.

Método de difusión en placa con penicilindros.

Ungüento de variotina lote G 00356.

Potencia en u/gr.

%

1)	1 010.79	101.08
2)	1 014.08	101.40
3)	1 015.90	101.60
4)	1 017.44	101.74
5)	1 018.86	101.88
6)	1 019.60	101.96
7)	1 019.80	101.98
8)	1 020.00	102.00
9)	1 020.79	102.08
10)	1 020.81	102.08
11)	1 021.19	102.12
12)	1 021.82	102.18
13)	1 022.63	102.26
14)	1 024.95	102.49

 $\bar{X} = 1\ 019.19\ \text{u/gr.} \qquad 101.92\ \%$

Desviación estándar = S = 3.51

Error estándar = ES = 0.94

Coeficiente de variación = cv = 0.3448

Método de difusión en placa con discos de papel.
 Ungüento de variotina lote G 00356.

Potencia en u/gr.

%

1)	1 011.89	101.19
2)	1 014.03	101.40
3)	1 014.33	101.43
4)	1 015.95	101.60
5)	1 016.30	101.63
6)	1 016.33	101.63
7)	1 017.78	101.78
8)	1 018.18	101.82
9)	1 018.79	101.88
10)	1 018.87	101.88
11)	1 019.04	101.90
12)	1 019.52	101.95

\bar{X} = 1 016.75 u/gr.

101.67 %

Desviación estándar = S = 2.28

Error estándar = ES = 0.66

Coefficiente de variación = cv = 0.065.

Prueba de t para el unguento de varietina.

$$t = 1.81$$

Límites fiduciales para el método de cilindro placa.

1 020.89 u/gr.
1 017.49

Límites fiduciales para el método con discos de papel.

1 017.94 u/gr.
1 015.55

Método de difusión en placa con penicilindros.
Loción de variotina lote K 90133.

Potencia en u/ml.

%

1)	788.0	98.5
2)	788.0	98.5
3)	792.0	99.0
4)	792.0	99.0
5)	792.0	99.0
6)	792.0	99.0
7)	792.0	99.0
8)	796.0	99.5
9)	796.0	99.5
10)	796.0	99.5
11)	800.0	100.0
12)	804.0	100.5

$\bar{X} =$ 794.0 u/ml.

99.25 %

Desviación estándar = $S = 4.47$

Error estándar = $ES = 1.29$

Coefficiente de variación = $cv = 0.56$

Método de difusión en placa con discos de papel.
 Loción de variotina.

Potencia en u/ml.

%

1)	788.0	98.5
2)	790.0	98.8
3)	791.0	98.9
4)	792.0	99.0
5)	792.0	99.0
6)	792.0	99.0
7)	792.0	99.0
8)	792.0	99.0
9)	793.6	99.2
10)	793.6	99.2
11)	796.0	99.5
12)	800.0	100.0

\bar{X} = 792.73 u/ml.

99.09 %

Desviación estándar = S = 2.85

Error estándar = ES = 0.82

Coefficiente de variación = cv = 0.36

Prueba de t para la loción de variotina.

$$t = 0.730$$

Límites fiduciales para el método de cilindro placa.

794.94 u/ml.
793.06

Límites fiduciales para el método con discos de papel

793.33 u/ml.
792.13

5.1. Segunda etapa.

Método de difusión en placa con discos de papel.
Ungüento de variotina.

Lote no.	u/gramo	%
C - 83693	992.06	99.2
H - 94971	995.35	99.5
M - 6010	1 000.00	100.0
N - 6509	1 004.90	100.5
C - 00445	1 009.62	101.0
J - 84268	1 010.00	101.0
H - 6406	1 012.30	101.23
H - 6203	1 012.89	101.30
C - 83974	1 014.70	101.50
G - 94433	1 019.23	102.00
C - 83694	1 020.00	102.00
G - 00356	1 024.06	102.40
M - 5705	1 028.13	103.00
M - 6611	1 052.15	105.20
R - 6304	1 081.84	108.00

$\bar{X} =$ 1 018.48 u/g. 101.85 %

Desviación estándar = S = 22.1

Error estándar = ES = 5.71

Coefficiente de variación = cv = 2.17

5.2. Método de difusión en placa con penicilindros.
Ungüento de variotina.

Lote no.	u/gramo	%
H - 94971	967.40	97.0
H - 6611	979.00	98.0
M - 6010	979.60	98.0
G - 00356	983.00	98.3
H - 6509	985.20	98.5
C - 00445	995.20	99.52
G - 94433	998.08	99.80
C - 83693	1 005.00	100.50
M - 5705	1 009.00	100.90
C - 83694	1 010.00	101.00
N - 6203	1 013.00	101.30
M - 6304	1 016.00	101.60
H - 83794	1 020.00	102.0
J - 84268	1 034.50	103.45
N - 6406	1 040.70	104.07

$\bar{X} =$ 1 002.38 u/g. 100.23 %

Desviación estándar = 20.4 = S

Error estándar = ES = 5.27

Coefficiente de variación = cv = 2.036

Prueba de t para el unguento de variotina.

$$t = 1.9468$$

Límites fiduciales para el método del disco de papel

1 026.14 u/g.
1 014.72

Límites fiduciales para el método de cilindro placa.

1 009.59 u/g.
999.05

5.3. Método de difusión en placa con discos de papel.
Loción de variotina.

Lote no.	u/mililitro	%
H - 3701	792.0	99.0
I - 90132	792.0	99.0
K - 90133	792.0	99.0
D - 83691	800.0	100.0
N - 3205	800.0	100.0
M - 3307	800.0	100.0
P - 4310	808.0	101.0
N - 4205	808.0	101.0
H - 3804	816.0	102.0
M - 33612	816.0	102.0
E - 94355	816.0	102.0
M - 3510	816.0	102.0
H - 94970	820.0	102.5
G - 94723	820.0	102.5
N - 3409	824.0	103.0
J - 84124	848.0	106.0

Y = 810.5 u/ml. 101.3 %

Desviación estándar = S = 14.27

Error estándar = ES = 3.57

Coefficiente de variación = cv = 1.76

Método de difusión en placa con penicilindros.

Loción de variotina.

Lote no.	u/mililitros	%
I - 90132	776.0	97.0
H - 3701	784.0	98.0
M - 3510	792.0	99.0
K - 90133	792.0	99.0
N - 4205	792.1	99.0
H - 3409	792.1	99.0
M - 3904	800.0	100.0
M - 3612	800.0	100.0
H - 3205	800.0	100.0
M - 3307	800.0	100.0
H - 3804	808.0	101.0
H - 94790	816.0	102.0
D - 83691	816.0	102.0
P - 4310	824.0	103.0
E - 94355	840.0	105.0
G - 94723	840.0	105.0
J - 84124	840.0	105.0

X = 806.6 u/ml. 100.82 %

Desviación estándar = S = 14.65

Error estándar = ES = 3.55

Coefficiente de variación = cv = 1.82

Prueba de t para la loción de variotina.

$$t = 0.6376$$

Límites fiduciales para el método del disco de papel

814.71 u/ml.
807.57

Límites fiduciales para el método de cilindro placa.

810.79 u/ml.
803.69

VI.- Análisis de resultados y conclusiones.

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico - fueron sometidos a la prueba de t students para muestras y se consideró una diferencia significativa a un nivel de $p = 0.05$.

Obteniéndose en la prueba, valores menores a los establecidos en la tabla para un número igual de muestras analizadas.

Por lo que se concluye que al no haber encontrado --- diferencias significativas, podemos utilizar para la determinación de la potencia de nuestro compuesto, -- cualquiera de las dos variantes hechas al método de difusión en placa de agar.

VII.- Revisión bibliográfica.

- 7.1. Un antibiótico fungicida fue aislado de un filtrado de cultivo de *Pecilomices varioti* Bainier var. antibioticus; el antibiótico se llamó variotina.

La variotina es una substancia aceitosa y soluble -- en muchos solventes orgánicos, excepto en éter de -- petróleo y agua, la fórmula presentada para variotina fue: $C_{18}H_{27}NO_4$.

La variotina presenta actividad contra varias clases de hongos y tiene baja toxicidad en ratones (15).

- 7.2. Recientemente un número de quimioterapéuticos para dermatomicosis han sido investigados y probados clínicamente. Sus ingredientes son en su mayor parte compuestos de mercurio, cloruros o fenol halogenados, -- conteniendo compuestos orgánicos del azufre y antibióticos.

1.- El espectro del antibiótico variotina se examinó con un número de hongos patógenos incluyendo la fuerte actividad de Trichophyton, Criptococcus, y Blastomices y algunos hongos fitopatógenos; pero es inactivo en -- bacterias.

2.- Los efectos de variotina fueron probados sobre -- nuevas cepas producidas de Trichophyton.

3.- La actividad de variotina decreció de un medio a -- un cuarto por la adición de suero del 10 - 50 %.

4.- La actividad de variotina no está influenciada por los amplios rangos de pH.

5.- En el tratamiento experimental de tricofitosis con loción de variotina, *Trichophyton* no desapareció.

6.- La aguda toxicidad de variotina administrada intra peritoneal, subcutánea y oralmente fueron muy bajas se observaron reacciones tóxicas en más de 160 000 u/Kg.- de peso corporal.

7.- Se concluyó que la preparación de variotina puede ser aplicada con toda seguridad. (1)

7.3. La variotina por sí misma es una sustancia inestable, pero es muy estable en soluciones de solventes orgánicos.

2.- Los solventes que estabilizan a la variotina son - en debido orden: Cetonas, esterés, y alcoholes. Mejores resultados son obtenidos con solución alcohólica al - 75 % que con alcohol puro.

3.- En solución alcohólica al 75 % con pH preferible entre 6.0 - 7.0 y sal disódica del ácido etilendiamino tetráctico o hidroxianizol butilado, tienen un -- excelente efecto de estabilización.

La estabilización varía con las concentraciones de - variotina y dentro de los límites de 800 - 8 000 --- u/ml., se obtuvo una mejor estabilidad con bajas con centraciones.

4.- El unguento de variotina en base de polietilenglicol es más estable a pH = 4.0, tiourea, metabisulfito de sodio o propilgalato tienen excelente efecto estabilizante.

7.4. 1.- La acción farmacológica del nuevo antibiótico variotina y sus productos de degradación fueron estudiados.

2.- Cambios no apreciables a excepción de ligero enrojecimiento de la piel fue observado cuando fue untada variotina consecutivamente sobre la piel normal, herida cortante, herida punzante o inyectada intra o subcutáneamente, no afectaron el hemograma, ni el peso corporal.

3.- La variotina no tuvo efectos sobre el corazón aislado de sapos, en bajas concentraciones, pero tuvo antagonismo en los movimientos de corazón a altas concentraciones en proporción a los niveles.

Efectos similares fueron observados con los productos de degradación de variotina.

La variotina en bajas concentraciones incrementa la amplitud del tono muscular de intestino aislado de conejos y puercos de guinea, mientras que en altas concentraciones decrece casi en proporción a los niveles de variotina.

Resultados similares fueron obtenidos con los productos de degradación.

De esta manera la acción de variotina sobre corazón e intestino, resume condiciones normales por la irrigación de soluciones de Ringer o Tirode.

La atropina antagoniza la acción depresiva de los movimientos del corazón por variotina. Una acción antagónica fue notada entre la acción depresiva de variotina sobre los movimientos intestinales y la acción de baric o acetilcolina, especialmente, la acción antitárico.

Una acción antagónica con histamina fue también observada.

Generalmente, variotina tuvo un pequeño efecto sobre la presión sanguínea y respiración de conejos pero -- una pequeña baja de la presión sanguínea y eceleración de la respiración fue observado con grandes dosificaciones. La atropina antagonizó esta acción, pero no después los efectos bilaterales.

4.- La sensibilidad de los conejos a las drogas actuando sobre sistema nervioso autónomo, la acetilcolina, pilocarpina y epirenamina fueron bajando con la aplicación consecutiva de variotina.

5.- De estos resultados no hay noticias de acción farmacológica en la aplicación externa de variotina desde la acción sobre órganos aislados, la respiración y la presión sanguínea, las concentraciones bajas de variotina fueron concluyentes a tener acción colinérgica aunque ligera.

Sobre los otros trabajos, la variotina en altas concentraciones tiene acción narcótica sobre músculos especialmente. La acción antibarium fue remarcable. El tono del sistema autónomo fue reprimido bajamente con aplicación consecutiva de variotina.

Los hechos de que la variotina deprime el tono del sistema nervioso autónomo en aplicaciones consecutivas indica esto, efectos clínicos favorables desde el punto de vista defence físico. (11)

- 7.5. Como se describió en los otros reportes, la variotina tuvo pequeños efectos sobre *Candida*, pero fue efectiva sobre *Trichophyton* claramente a bajas concentraciones.

La inactivación por proteína del suero fue examinado por pruebas bacteriostáticas in vitro y curvas de crecimiento y pruebas de inhibición respiratoria de *Candida albicans*, que fueron reportados después de experimentos repetidos.

La solución de variotina mostró un grado de efectividad de 77.2 % y el unguento de variotina de 58.8 %. Reacciones secundarias fueron encontradas con solución de variotina en 8.3 % de pacientes pero ningún caso con unguento de variotina. (27)

- 7.6. Líquido de variotina (loción de variotina) una nueva droga fúngica fue aplicada a *Pityriasis versicolor*, *Trichophytia pompholyiformis*, *Trichophytia eczematosa* y *Trichophytia maculovesiculosa*.

El grado de efectividad de 80.6 % fue obtenido sólo--
mente un caso y fue suspendido el tratamiento por ---
reacciones secundarias. (21)

- 7.7. 1.- La variotina fue administrada localmente en 36 --
pacientes con dermatomicosis.
2.- En 24 pacientes con tinea pedis, el grado de efec--
tividad fue de 82.6 %.
3.- En 12 pacientes con tinea cruris el grado de efec--
tividad fue de 83.3 %, en general, lesiones hiperquera--
tótica fueron menos fiables para este agente.
4.- En un caso de tinea pedis, dermatitis por contac--
to como un efecto secundario ocurrió 8 días después -
de la aplicación . (18)
- 7.8. La variotina fue efectiva en 85.7 % de tricofitosis,
el efecto es marcadamente en comparación con viejos
terapéuticos para tricofitosis.
2.- La variotina es efectiva sobre ambas lesiones se--
cas y húmedas. Aplicaciones prolongadas de variotina
fueron hechas una semana después de la cura para ---
prevenir recurrencias en muchos casos.
3.- No hubo efectos secundarios. El uso de variotina
es recomendado porque es incolora y no tiene olor --
fétido. (15)
- 7.9. 40 pacientes entremezclados con dermatofitosis proba--
da y tratada con variotina; 4 pacientes limpios, 12--
pacientes mostraron mejoramiento, y 18 pacientes mos--
traron respuesta favorable. (6)

7.10. La tintura de variotina es una de las más excelentes drogas fúngicas para ser usadas en infecciones superficiales de hongos. (23)

7.11. 17 pacientes con varias enfermedades de hongos de la piel fueron tratados con loción de variotina.

Fueron observados progresos en 76 % de ellos, la preparación tiende a ser más efectiva en tratamientos de infecciones superficiales de hongos. Comparado con -- otros fungicidas como es al ungüento de tricomicina, -- ungüento de nistatina, no mancha la ropa y tiene un -- olor agradable y puede ser uno de los más excelentes agentes fúngicos de uso tónico. (29)

7.12. Aunque la efectividad de variotina en tricofitia es -- inconclusa en este estudio preliminar con una pequeña cantidad de pacientes y en un corto tiempo, un efecto considerable esta sugiriendo que requiere experimen -- tos clínicos posteriores.

Los presentes autores intentaron la prueba de varioti -- na en tricofitia, especialmente en Trichophytia pon -- pholycoformis, que se incrementa con el verano. (9)

7.13. 1.- La variotina no tiene actividad contra bacterias pero es fuertemente activa contra hongos, especialmen -- te con Criptococcus y Trichophyton.

2.- Resistencia a la variotina es raramente adquirida y antagonismo definido no ha sido sin embargo probado

3.- Variosina tiene una actividad relativamente inefi

caz contra protozoarios comparado contra otros anti--
bióticos antibacteriales y fungales. Esto indica su -
baja toxicidad en el huesped.

4.- Variotina inhibe fuertemente la respiración de -
protozoarios y células tumorales de Ehrlich pero no a
los Criptococcus. (17)

7.14. 1.- Las aplicaciones consecutivas de variotina por --
2 - 4 semanas fueron marcadamente efectivas en 32 ---
casos, efectivas en 19 e inefectivas en 16 de 67 y el
grado de efectividad fue de 76 %.

2.- En casos efectivos que fue negativa para hongos a
inmediatamente después del tratamiento. Los hongos --
fueron detectados microscópicamente en 4 casos de 13
después de 16 - 45 días.

3.- Fue imposible encontrar una relación entre la rede-
tección de hongos y tipos de infecciones, pero los --
hongos fueron detectados en 1 de 7 casos marcadamente
efectivos y en más de la mitad de casos efectivos.

Resultados similares fueron obtenidos en la siguiente
observación aplicando drogas mercuriosas.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Akira Matsuda, Noboro Hachiya and Yoshio Kawamura.
" Studies on Antifungal Activity of Variotin ".
Research Laboratory, Oji Pharmaceutical Plant,
Nippon Kayaku Co. (1959).
- 2.- Constantine John Alexopoulos.
Introducción a la Micología.
- 3.- Darío Rodríguez Devesa - Amalia Navarro Medina.
Control de la Calidad durante la Fabricación de -
productos Farmacéuticos y Cosméticos.
- 4.- Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos.
Cuarta Edición Mex. 1974.
- 5.- Frederick Kavanagh.
Analitical Microbiology.
- 6.- Hiroaki Miyazaki, Shigeru Tanuma, Kazuo Kuroda,
Tetsuya Horie, Hideo Yaguchi, Kisaharu Sato, Eizu
Yahagi and Toshiro Maeda.

" Experimental and Clinical Studies on Variotin.
A Preliminar Report ".
Department of Dermatology, Faculty of Medicine Juntendo
University . (june 1, 1955).

- 7.-- Hiroshi Yamaguchi, Yuya Nakayama, Tomohisa Takita
Ehohiro Akito, Wataru Tanaka, Keihei Veno, and --
Kosaku Tahara.
" Studies on Stabilization of Variotin ".
Oji Pharmaceutical Plant, Nippon Kayaku Co. LTD.
(July 1, 1959).
- 8.-- Jose Helman.
Farmacotecnia Teórica y Práctica.
1981.
- 9.-- Kazuo Tanaka and Takeo Ono.
" Clinical Experience with Variotin in Dermatolo--
gical Disease Caused by Trichophyton ".
Department of Dermatology, Nagoya University Medical
School ".
Director: Prof. Kahchiro Kano.
(July 11, 1959).
- 10.-- Kazuo Uemetsu.
Clinical Effect of Variotin on Dermatomycosis.
Department of Dermatology.
Director: Prof. K. Higuchi. Faculty of Medicine
Kyushu University: Fukuoka, Japan. (June 1, 1959).
- 11.-- Masayuki Nakatsuka, Harue Aratani, Koji Oshita,
Hisae Mikawa, Shigenori Mikawa and Akie Tsuchimoto
" Pharmacological Studies on Variotin ".
Department of Pharmacology, Hiroshima University.
(June 20, 1959).

- 12.- Antibiotics and their Laboratory Control.
- 13.- Riken Yasuda and Kiminori Yoshida.
" The Effects of Variotin on Dermatococcosis II "
On the relation between Therapeutic Result and -
Detection of Fungi after Treatment.
Department of Dermatology Kanto Teishin Hospital
Tokio.
(July 1, 1959).
- 14.- Seichi Kitamura and Masayuki Motomura.
" Treatment on fungous Diseases and Antibiotic -
Test with Variotin ".
Department of Dermatology, Nagasaki University-
Medical School.
(July. 22, 1959).
- 15.- Setsuo Takeuchi, Hiroshi Yonehara and Hamao Ume-
zawa.
" Studies on Variotin, a new Antifungal Antibio-
tic I ".
Preparations and Properties of Variotin, Institute
of Applied Microbiology University of Tokio.
- 16.- Shuzaburo Ohmori Junichi Kutsukake, Jiro Egawa
and Naosaki Ikeda.
" Experience in the Treatment of Trichophytosis-
and Interin Report ".
Department of Dermatology, the Keiyu Hospital -
Yokohama.

(May 29, 1959).

- 17.- Shigemi Susuki, Atsushi Saganuma, Tsunataro, Kishida, Akio Mizumoya, Fumiko Veda, Yoshitaka Susuki, Ichiro Kiji, Taiyo Kyo and Mannei Takeuchi.
 " Activity of Variotin, a New Antifungal Antibiotic ".
 Department of Microbiology Kyoto Prefectural Medical College.
 Shozo Nakazawa, Nurie Kishi and Sumie Tsamura.
 (Department of Microbiology Kyoto).
 (July 14, 1955).
- 18.- Shinya Takahashi and Gyo Fukushi.
 " The Therapeutic Effect of Variotin a New Antifungal Antibiotic on Tinea Pedis and Tinea Cruris ".
 The Department of Dermatology, Tohoku University Sendai.
 (Prof. Takahashi), (June 1, 1959).
- 19.- Shigeo Abe, Setsuo Takeuchi and Hiroshi Yonehara
 " Studies on Variotin a New Antifungal Antibiotics II ".
 Taxonomical Studies on Variotin - Producing Strain.
 Institute of Applied Microbiology, University of-Tokio.
 (July 27, 1959).
- 20.- The Merck Index 8ava. Ed. pag. 786.

- 21.- Taro Kawamura, Katsuo Nishihara, Akira Minami ---
and Yukio Shirasaki.
" Therapy of Dermatococcosis with Variotin Liquid
an Antifungal Agent "
Department of Dermatology and Urology Medical Fa-
culty Kanazawa University. (Director of Section
of Dermatology. Prof. Taro Kawamura). (July 20,
1959).
- 22.- Takeuchi Yonehara.
Structure . Et. Al J. Antibiotics 17 A, 267
(1964).
- 23.- Tatsuji Kobori, Junro Narumi and Itsuro Ota.
" Evaluation of the Effect of Variotin Tinture
to the Superficial Fungous Infections of Skin ".
Dermatological Department, Tokio Teiskin Hospital
(May 29, 1959).
- 24.- Tetraedron Letters. 1966 - 5197.
- 25.- U.S. Pharmacopeia (1975).
- 26.- U.S. Pharmacopeia - National Formulary 1981.
- 27.- Yasuhiko Saida, Kihel - Tanioku and Toshiharu -
Osawa. " Clinical Experiment of Variotin ".
Department of Dermatology and Urology Shinshu -
University.
(June 20, 1959).

- 28.- Yoshiro So and Osamu Kanauchi.
Therapeutic Effect of Variotin to Dermatomycoosis.
Department of Dermatology, Faculty of Medicine -
Kyoto University.
(Director Prof. T. Yamamoto). (July 1, 1959).
- 29.- Yusho Miura, Takeshi Onodzuka and Hideomi Shibari.
" The Therapeutic Effect of Variotin Liquid on ---
Fungous Diseases of the Skin ".
Department of Dermatology.
(Director Prof. Y. Miura).
Hokkaido University School of Medicine Sapporo
Japan.